

## 肺リンパ脈管筋腫症細胞を認識する新規抗ポドプラニン抗体の同定

著者	鎌田 悟史
号	85
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3475号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00097112">http://hdl.handle.net/10097/00097112</a>

(書式12)

氏 名	かまた さとし 鎌田 悟史
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学 専攻
学位論文題目	肺リンパ脈管筋腫症細胞を認識する新規抗ポドプラニン抗体の 同定
論文審査委員	主査 教授 岡田 克典 教授 黒澤 一 教授 大和田 裕二

## 論 文 内 容 要 旨

リンパ脈管筋腫症 lymphangioliomyomatosis (LAM) は、生殖可能年齢の女性に発症し、重症例では約 10 年の経過で進行性の呼吸不全により死亡する難病である。LAM の病態解明・治療法の開発は重要な課題であるが、現在 LAM 細胞を特異的に認識する抗体は存在せず、LAM 細胞 (リンパ脈管筋腫症の組織を構成する平滑筋に似た特徴をもつ細胞) を単離して詳細な細胞機能解析を行うことは出来ない。

I 型膜貫通タンパク質であるポドプラニン (別名: Aggrus/Tlalpa) はリンパ管内皮のマーカーとして使用されており、一部の悪性腫瘍や LAM でも発現していることが報告されている。近年、癌細胞に発現しているポドプラニンは、正常細胞と異なった癌種特異的な糖鎖修飾を受けていることが判明してきている。このことは異常細胞である LAM 細胞に発現するポドプラニンも LAM 特異的な糖鎖修飾を受けている可能性を示唆している。現在、様々な糖鎖修飾ポドプラニンを認識する特異的抗体の開発が進められており、おもに腫瘍性疾患をターゲットにした抗体医薬の開発が進められている。そこで、本研究ではポドプラニンの糖鎖の種類の違いや糖鎖の付加位置の違い、更には糖鎖付加による立体構造の違いを認識する新規抗ポドプラニン抗体のスクリーニングを行い、LAM 細胞を認識する新規抗ポドプラニンモノクローナル抗体の同定を行った。

我々はまず東北大学大学院医学系研究科地域イノベーション分野加藤教授より提供された新規抗ポドプラニン抗体 20 種を用いて、LAM 肺組織に対しての免疫組織染色を行った。結果その中で最も高い染色性を示した LpMab-17 抗ポドプラニン抗体を同定し、またその抗体は既存の抗ポドプラニン抗体である D2-40 よりも LAM 組織に対し強い染色性を示すことを明らかにした。次に LAM 肺から肺細胞懸濁液を作成し、フローサイトメトリーにて、LpMab-17 抗ポドプラニン抗体にて認識される新規細胞集団の有無について、既存の NC-08 抗ポドプラニン抗体も使い、比較検討を行った。LpMab-17 抗体では既存抗ポドプラニン抗体を用いた時と異なり、EpCAM<sup>-</sup>/LpMab-17<sup>low</sup> の新たな細胞集団が認められた。さらに LpMab-17 抗体で分画される細胞分画の中で、どの細胞分画に LAM 細胞が多く含まれているかの検証のため、セルソーターにて分離した細胞サンプルの抗 HMB-45 抗体 (LAM 細胞マーカー) による蛍光免疫染色による検討を行った。結果、HMB-45 陽性細胞は有意に CD45<sup>-</sup>/EpCAM<sup>-</sup>/LpMab-17<sup>high</sup> 細胞分画に多く含まれており、LpMab-17 にて認識された細胞集団に LAM 細胞がより多く含まれることが判明した。

今回の研究で用いた新規抗ポドプラニン抗体はそれぞれ異なったポドプラニンの糖鎖修飾部位もしくは糖鎖付加による立体構造の違いを認識するものである。これら抗体のポドプラニン糖鎖修飾認識部位の違いは染色性の違いとなって表れた。免疫組織学的解析にて、最も LAM に対し

(書式12)

染色性の高かった LpMab-17 は、フローサイトメトリーによる解析でも、陽性の細胞分画に LAM 細胞の存在を認めた。今回の解析結果はこれまで報告のあった悪性胸膜中皮腫や肺扁平上皮癌と同様に、LAM のポドプラニン糖鎖修飾の存在を示唆している。LAM のポドプラニン糖鎖修飾のさらなる検証は LAM 細胞特異的な抗体および抗体医薬の開発につながると考えられた。

## 審査結果の要旨

博士論文題目 ..... 肺リンパ脈管筋腫症細胞を認識する新規抗ポドプラニン抗体の同定 .....

所属専攻・分野名 ..... 医科学専攻 ..... 呼吸器外科学分野 .....

学籍番号 B2MD5030 ..... 氏名 ..... 鎌田 悟史 .....

リンパ脈管筋腫症 lymphangi leiomyomatosis (LAM) は、生殖可能年齢の女性に発症し、重症例では約 10 年の経過で進行性の呼吸不全により死亡する難病である。LAM の病態解明・治療法の開発は重要な課題であるが、現在肺リンパ脈管筋腫症細胞（LAM 細胞）を特異的に認識する抗体は存在せず、LAM 細胞を単離して詳細な細胞機能解析を行うことは出来ない。本研究は、LAM の原因となっている LAM 細胞に対する特異的な抗体を開発して LAM 細胞の単離を可能にすることにより、その病態解明に寄与する事を目的に開始されたものである。新規抗ポドプラニン抗体 20 種を用いて、LAM 肺組織に対しての免疫染色を行った結果、その中で最も高い染色性を示した LpMab-17 抗体を同定し、またその抗体は既存の抗ポドプラニン抗体である D2-40 よりも LAM 組織に対し高い染色性を示すことを明らかにした。また LpMab-17 の詳細な解析では、グリア細胞である LN229 に human podoplanin (hPDPN) を導入した LN229/hPDPN に反応するが、LN229 には反応しないことから LpMab-17 はポドプラニン特異的抗体であることが確認され、また LpMab-17 のエピトープ解析では Gly77-Asp82 の GIRIED と判明し、これまでの既存ポドプラニンとは異なったエピトープをもつ抗体であることが明らかとなった。LAM 肺組織から肺細胞懸濁液を作成し、フローサイトメトリーにて LpMab-17 を用いて分離した細胞サンプルの抗 HMB-45 抗体による蛍光免疫染色での検討を行った結果、HMB-45 陽性細胞は有意に  $CD45^{-}/EpCAM^{-}/LpMab-17^{high}$  細胞分画に多く含まれており、LpMab-17 にて認識された細胞集団に LAM 細胞がより多く含まれることが判明した。これまで LAM のポドプラニン糖鎖修飾については全く解析が行われておらず、本研究の結果は LAM においても悪性胸膜中皮腫、肺扁平上皮癌と同様にポドプラニン糖鎖修飾が存在する可能性を初めて明らかにした。このような報告はこれまでなく、本研究は極めて新規性に富むものであり、また今後 LAM 細胞の同定分離、抗体医薬の開発につながる可能性のある臨床的意義の大きなものである。よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。